

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Tanja Vrbanić

6616/BT

**UTJECAJ SISTEMSKE BIOLOGIJE NA BUDUĆA
ISTRAŽIVANJA O VINU
ZAVRŠNI RAD**

Modul: Biotehnološki aspekti proizvodnje vina

Mentor: Dr. sc. Vesna Zechner-Krpan, red. prof.

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom red. prof. dr. sc. Vesne Zechner-Krpan.

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

UTJECAJ SISTEMSKE BIOLOGIJE NA BUDUĆA ISTRAŽIVANJA O VINU

Tanja Vrbanović, 6616/BT

Sažetak: Cilj završnog rada bio je prikazati kako sistemska biologija utječe na buduća istraživanja o vinu. Objašnjena je proizvodnja crnih i bijelih vina, od berbe, prerade, alkoholne fermentacije do punjenja vina u boce. Opisano je kako biotehnologija kvasaca djeluje na prehrambenu tehnologiju i tehnologiju pića. Detaljno je objašnjen razvitak sistemske biologije, podjela sistemske biologije na područja istraživanja. Navedeni su napretci u istraživanjima u tehnologiji vina te je objašnjeno kako sistemska biologija i biotehnologija mogu djelovati zajedno.

Ključne riječi: kvasci, sistemska biologija, vino

Rad sadrži: 34 stranice, 5 slika, 105 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Dr. sc. Vesna Zechner-Krpan, red. prof.*

Rad predan: rujan 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD**Final work****University of Zagreb****Faculty of Food Technology and Biotechnology****Undergraduate studies Biotechnology****Department of Biochemical Engineering****Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology****THE INFLUENCE OF SYSTEM BIOLOGY ON FUTURE RESEARCHES IN
WINE MAKING**

Tanja Vrbanović, 6616/BT

Abstract: The goal of this final work was to ascertain the influence of system biology on future researches in wine making. The production of red and white wine was explained, from harvesting of wine grapes, must treatment, alcoholic fermentation to filling wine in the bottles. Furthermore, the interactions between yeast biotechnology and food and drink technology, were explained. Also, the development of system biology and its division on fields of researches, was listed and explained. Finally, the progress in up-to-date research in wine technology and how system biology and biotechnology can work together, were elucidated.

Keyword: system biology, yeast, wine

Thesis contains: 34 pages, 5 figures, 105 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Vesna Zechner-Krpan, PhD, Full Professor*

Thesis delivered: September 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Osnovne karakteristike vina	2
2.2. Proizvodnja vina	2
2.2.1. Berba grožđa	2
2.2.2. Runjanje-muljanje	3
2.2.3. Prešanje	4
2.2.4. Sumporenje	5
2.2.5. Taloženje.....	5
2.2.6. Alkoholna fermentacija.....	6
2.2.7. Jabučno-mliječna fermentacija	10
2.2.8. Pretakanje vina.....	10
2.2.9. Bistrenje vina	11
2.2.10. Filtracija vina	11
2.2.11. Punjenje vina u boce	11
2.3. Biotehnologija kvasaca u prehrambenoj industriji i industriji pića	12
2.4. Sistemska biologija.....	13
2.4.1. Razvitak sistemske biologije.....	13
2.4.2. Pozadina biologije stanica.....	14
2.4.3. Genomika	15
2.4.4. Transkriptomika	16
2.4.5. Proteomika	18
2.4.6. Metabolomika	19
2.4.7. Fluksomika.....	21
2.4.8. Interaktomika	22

2.5. Sistemska biologija i biotehnologija.....	23
3. ZAKLJUČCI	25
4. LITERATURA	26

1.UVOD

Industrijska proizvodnja vina povezuje vinogradare, proizvođače vina, procesne inženjere i znanstvenike sa zbunjujućim mnoštvom nezavisnih i poluzavisnih parametara, koji su u većini slučajeva optimizirani metodom pokušaja i pogrešaka. Nadalje, kako je većina parametara izvan individualne kontrole, predvidljivost i dosljednost krajnjeg proizvoda teško je postići. Tradicionalne vinske znanosti vinogradarstva i enologija prikupile su podatke i znanja, što je rezultiralo značajnom optimizacijom procesa uzgoja grožđa i proizvodnje vina. Međutim, velik dio tih procesa temeljen je na empirijskim, pa čak i vjerodostojnim navodima, a samo mali dio svih interakcija i uzročno-posljedičnih veza između pojedinih ulaznih i izlaznih parametara je znanstveno dobro razjašnjen. Doista, složenost postupka je onemogućila dublje razumijevanje tih interakcija i uzročnih odnosa.

Nove tehnologije i metode u biološkim i kemijskim znanostima, u kombinaciji s poboljšanim alatima analize podataka, otvorile su nove mogućnosti pristupa procesima rasta i izrade vina. Ovaj rad prikazuje trenutne napore u kojima se koriste znanja sistemske biologije pri boljem razumijevanju složenih industrijskih procesa, kao što je proizvodnja vina.

2.TEORIJSKI DIO

2.1. Osnovne karakteristike vina

Prema Zakonu o vinu iz 1996. godine, vinom se smatra proizvod dobiven alkoholnim vrenjem mošta ili masulja od svježeg (ili prosušenog) grožđa plemenite vinove loze *Vitis vinifera*. Vina se dijele na vina u užem smislu riječi (mirna, pjenušava, biser i gazirana vina), specijalna vina (desertna, aromatizirana, likerska vina), prema boji (bijela, ružičasta i crna ili crvena), prema sadržaju neprevrelog šećera (slatka, poluslatka, suha i polusuha), koncentraciji etanola (slaba, normalna i jaka), aromi (aromatizirana, nearomatizirana i prijelazna), starosti (mlado, staro i arhivsko), sortnoj čistoći (sortna, sljubljena), vremenu berbe i zrelosti (kasna, izborna, ledena), kakvoći vina (stolna, kvalitetna i vrhunska) te prema postupcima i metodama proizvodnje (obična i specijalna).

Hrvatska je zemlja duge tradicije proizvodnje vina. S godinama se povećavao broj vinograda te time proizvodnja i kvaliteta vina. Temeljem Pravilnika o vinu, vinogradarsko područje Republike Hrvatske dijeli se na dvije regije, kontinentalnu i primorsku Hrvatsku. U kontinentalnoj se većinom proizvode bijela vina, dok u primorskoj Hrvatskoj prevladavaju crna vina. Neke od poznatijih sorti su Graševina, Malvazija istarska, Plavac mali te Dingač, koji je ujedno i zaštićen po Ženevskoj Konvenciji.

2.2. Proizvodnja vina

2.2.1. Berba grožđa

Berba grožđa je prvi, vrlo važan korak u proizvodnji vina, koji određuje kvalitetu i senzorna svojstva vina. Podrum u kojem se grožđe prerađuje i mošt vrije (vrionica) te prostorija za njegu vina, moraju se dezinficirati i držati besprijeckorno čistima. Naime, bolesti i mane vina su najčešće posljedica nepravilnosti i grešaka učinjenih u početku prerade grožđa, a odnose se uglavnom na nekvalitetno grožđe, neodgovarajuće mjesto prerade, nečistoću posuda te nepravilno vrenje.

Vinogradar prije berbe, prateći analitičke pokazatelje i promjene na grozdu, određuje u kojem stadiju zrelosti se nalazi grožđe te se ono bere kada bobice i grozd dosegnu najveću težinu, a koncentracije šećera i kiselina budu optimalne. Berba se obavlja ručno ili mehanički, a grožđe se bere ujutro, kada temperatura nije previsoka ili tijekom dana bez kiše, a ne tijekom visokih temperatura zraka. Ono se može odmah sumporiti, a do podruma mora stići

neoštećeno, jer u suprotnom dolazi do oksidacije i smanjene kvalitete vina. Obrano grožđe treba što prije transportirati do mjesta prerade zbog toga što na kvalitetu budućeg vina uvelike utječe brzina kojom se grožđe dalje prerađuje. Sorta vinove loze je značajan čimbenik kvalitete grožđa, a u konačnici i vina. Svaka sorta ima svoje specifičnosti u pogledu sadržaja šećera, kiselina, tvari arome, boje i drugih komponenata te zastupljenosti pojedinih dijelova grozda kao što su peteljkovina, pokožica ili sjemenke. Primjerenim tehnološkim postupcima i dobrim izborom kultivara moguće je postići visoku kvalitetu finalnog proizvoda (Muštović, 1985).

2.2.2. Runjanje-muljanje

Runjanje-muljanje je početna faza prerade koja se danas obavlja motornim ili ručnim muljačama, dok se nekada grožđe gazilo nogama. Runjanjem se bobica odvaja od peteljke, a muljanjem se bobica gnječi kako bi se dobio mošt. Preporuča se uporaba runjača, zbog toga što peteljka sadrži tanine i druge tvari koji vinu daju trpak i gorak okuste pesticide kojiloše utječu na zdravlje u većim količinama. Otapanje navedenih tvari je pojačano vrenjem, jer te tvari nisu topive u moštu nego u alkoholu koji nastaje tijekom vrenja. Sve to uvelike utječe na kvalitetu vina. Muljanje se odvija prije odvajanja peteljki (stolna vina), poslije odvajanja peteljki (kvalitetna vina) ili istovremeno (centrifugalne muljače). Runjača-muljača sastoji se od lijevka za prihvat grožđa, rupičastog valjka za odvajanje bobice od peteljkovine i valjaka koji gnječe bobice te je prikazana na Slici 1 (Anonimus 1, 2016). Treba paziti da valjci na runjači-muljači nisu preblizu i da gnječe samo bobice, a ne i sjemenke i peteljkovinu, jer njihovi sokovi kvare okus vina. Valjci se izrađuju od drva, plastike, željeza ili aluminija, iako željezni valjci nisu najpovoljniji, jer ih otapaju kiseline mošta pa se željezo pojavljuje u vinu i izaziva mane (crni lom). Čvrsti i tekući dio tako zgnječenog grožđa zajedno nazivamo masulj, a samo tekući dio nazivamo groždani sok ili mošt. Mošt se najvećim dijelom sastoji od vode (75-80%), šećera (groždani – glukoza i voćni – fruktoza) i kiselina (vinska, limunska, jabučna, jantarna itd.). Ostali sastojci prisutni u vinu su: dušične tvari, mineralne tvari, tvari boje, tvari arome i vitamini (Zoričić, 1996).



Slika 1. Runjača-muljača (Anonimus 1, 2016)

2.2.3. Prešanje

Nakon runjanja-muljanjaslijedi prešanje komine tj. masulja, a ono se može izvoditi s prekidima (diskontinuirano) ili bez njih (kontinuirano). Na Slici 2. prikazana je kontinuirana preša (Anonimus 2, 2016). Masulj ili komina podvrgavaju se pritisku kojim se postiže maksimalno izdvajanje soka, ali bez štetnog djelovanja na kvalitetu budućeg vina. Prema vrsti pritiska, preše mogu biti mehaničke, hidrauličke, pneumatske ili kontinuirane. Prešanje se odvija u dvije faze: prskanje kože bobica za oslobađanje samotoka iz sredine bobice i gnječenje bobica pod povećanim pritiskom za oslobađanje soka iz periferne zone siromašne šećerom, a bogatije polifenolima. Samom postupku treba se pristupiti što je moguće brže, a ciklus prešanja mora biti što kraći zbog izbjegavanja nepoželjne oksidacije mošta. U tijeku prerade grožđa 40 – 70 % mošta dobiva se postupcima koji prethode tiještenju, a to je muljanje odnosno cijedenje, a tiještenjem se dobiva ostatak mošta. Osnovni sastojci mošta nakon prešanja su voda, ugljikohidrati, alkoholi, organske kiseline (jabučna, vinska, limunska), minerali, dušične tvari, fenolni spojevi, taninske tvari, tvari boje, ulje, masti, vosak, enzimi, vitamini te tvari koje čine aromu.



Slika 2. Kontinuirana preša (Anonimus 2, 2016)

2.2.4. Sumporenje

Nakon prešanja, mošt se sumpori kako bi se spriječila oksidacija, spontana fermentacija (zaustavio rad nepoželjnih kvasaca i bakterija) i potpomoglo taloženje (sumpor pospješuje koagulaciju tvari mutnoće). Sumpor se koristi u obliku kalijeva metabisulfita. Količina sumpora koja se dodaje u mošt ovisi o pH vrijednosti, dozrelosti grožđa, temperaturi grožđa i mošta, kiselosti mošta, trenutku sumporenja, načinu miješanja te o zdravstvenom stanju grožđa pa se tako nezrelo i bolesno grožđe treba čim brže obraditi i takav mošt više sumporiti. Sumporenje crnih vina je važno, jer se pojačava proces maceracije čvrstih dijelova masulja. Budući da su sumporenjem neutralizirani nepoželjni, divlji kvasci i bakterije, a plemeniti kvasci umrtvljeni, u bistri, slatki mošt dodaju se selekcionirani vinski kvasci.

2.2.5. Taloženje

Nakon prešanja, mošt treba brzo ohladiti na temperaturu optimalnu za taloženje (10 °C) ili za kontrolirano vrenje (15 -17 °C). Taloženje se može provoditi i uz pomoć enzima (brže i sigurnije bistrenje, bistrenje pri višim temperaturama), ali i dodatkom nekih bistrila (bentonit), u slučajevima jako zaraženog (bolesnog) grožđa ili u sušnim godinama, kad se očekuju kasniji problemi s bistrenjima vina. Također je moguća i primjena aktivnog ugljena i drugih enoloških preparata, kojima se već u problematičnom moštu rješavaju loši mirisi, boje i okusi.

2.2.6. Alkoholna fermentacija

Nakon obrade mošt se pretače u bačve gdje se odvija alkoholna fermentacija. Uzročnik alkoholnog vrenja u vinu je vinski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* koji se nalazi na pokožici bobice. U moštu u kojem je rastvoren šećer, započinje njegovo intenzivno razmnožavanje, a u anaerobnoj fazi kvasci razlažu šećer na razne spojeve, a najviše na alkohol i CO₂, najvažnije i osnovne produkte. Uz alkohol, u vinu se u manjim količinama nalazi i niz raznih drugih spojeva poput glicerola, octene, jantarne i drugih kiselina te nastaje i određena količina energije koja se oslobađa u vidu topline.

Pri vrenju razlikujemo tri glavne faze: početno, glavno (burno) i završno (tiho) vrenje, a s napretkom vrenja mijenja se i temperatura mošta. U početku alkoholne fermentacije mošt se jako zamuti, stvaraju se mjehurići i debela pjena te započinje vrenje pa temperatura poraste za 10, 20 i više stupnjeva Celzija. Pod utjecajem raznih čimbenika kao što su nepoželjna temperatura, sastav mošta, nepoželjni mikroorganizmi i dr., može doći do prekida vrenja. S obzirom na to se poduzimaju odgovarajuće mjere kao napr. taloženje mošta ili pasterizacija uz uporabu selekcioniranih kvasaca ili jačim sumporenjem grožđa. Kvasci obično prestaju s radom pri temperaturi od 35 – 40 °C, a na visokim temperaturama dolazi i do gubitka mirisnih tvari i alkohola, jakog pjenjenja te razlijevanja vina. Mošt koji vrije kod previsoke temperature može i prestati sa vrenjem prije kraja fermentacije svog šećera, jer se kvasci iscrpe, prije nego jesav šećer potrošen. Visoke temperature fermentacije daju vina slabije kvalitete i postoji opasnost da se počnu razmnožavati i patogeni mikroorganizmi. Idealna temperatura za fermentaciju bijelih moštova je ona između 16 – 22 °C. Također, vrenju ne pogoduju ni preniske temperature (manje od 10 °C), jer je tada ono slabo i dugotrajno, a može doći i do prestanka vrenja usprkos neprovrelom šećeru što je česta pojava u mnogim podrumima u kasnu jesen. Kod prekida vrenja postoji opasnost od pojave hlapljivih kiselina, octikavosti, nepoželjnog sastava mošta, visoke koncentracije šećera, nedovoljnog sadržaja kiselina, visokog sadržaja SO₂, CO₂ itd. Idealna fermentacija je ona sa što kraćom predfermentativnom fazom te ravnomjernom i čim dužom fermentacijom. Moštovi s velikom koncentracijom šećera također mogu predstavljati problem, jer oni teško započinju fermentaciju i teško je završavaju. Vrenjem moštova na optimalnim temperaturama dobiva se vino s većom količinom alkohola, izraženijeg bukea i s manjim sadržajem octene kiseline. Osim temperature, ostali fizikalni čimbenici koji utječu na fermentaciju su osmotski tlak

(gustoća mošta), unutarnja površina mošta (mutni mošt vrije intenzivnije) te tlak ugljičnog dioksida.

Jedan od važnijih kemijskih čimbenika koji utječu na tijek alkoholne fermentacije je kisik, jer kvasci za svoj rast i razmnožavanje trebaju kisik pa mošt, do početka vrenja, treba biti u kontaktu sa zrakom. Na gornji otvor bačve postavlja se vreljnjača s vodom prikazana na Slici 3. (Anonimus 3, 2016), koja omogućuje praćenje tijeka fermentacije, izlazak plinova (CO_2) iz bačve te sprječavanje ulaska zraka i nečistoća čime počinje anaerobni proces. Ako dođe do zastoja fermentacije, mošt treba ponovno prozračiti da bi se potaknulo razmnožavanje kvasaca.



Slika 3. Vreljnjača (Anonimus 3, 2016)

Sljedeći važan čimbenik je količina kiselina u moštu, jer su one bitne za pravilan tijek fermentacije, osiguravajući optimalnu pH vrijednost (3 – 4) potrebnu za rad kvasaca. U moštu i vinu nalaze se organske kiseline, kao što su: vinska, jabučna, mliječna, jantarna, ugljična i octena. Kvasci su vrlo osjetljivi na octenu kiselinu koja se počinje stvarati već u ranoj fazi fermentacije, iako je djelomično proizvode i sami kvasci. *Saccharomyces* obično proizvodi octenu količinu u granicama od 100 - 200 mg/L, na što utječe soj kvasca, temperatura vrenja i sastav mošta (Boulton i sur., 1996).

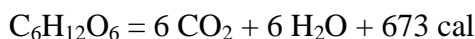
Različiti metali, kao što su bakar, željezo, aluminij, cink, prisutni na grožđu od tretiranja zaštitnim sredstvima ili sa strojeva mogu usporiti ili zaustaviti fermentaciju, a također i antibiotik botriticin koji izlučuje gljiva *Botrytis cinerea* (prisutna na grožđu koje je zaraženo sivom plijesni) može usporiti vrenje. Količina alkohola je također važna, jer različiti sojevi kvasaca podnose različite koncentracije. Vanjski faktori koji inhibiraju fermentaciju su pesticidi, antiseptici, antivitamini (blokiraju metabolizam kvasaca) te zračenje.

Zbog navedenih razloga, vrlo je važno kontrolirati intenzitet fermentacije i kvaščeve stanice vreljnjacom, kušanjem vina ili određivanjem ostatka neprovrelog šećera.

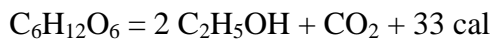
Kvasac koristi energiju na dva načina: iz šećera u moštu putem respiracije, čime razlaže šećer uz prisustvo kisika te ga koristi za razmnožavanje, i fermentacije koja se odvija bez prisustva kisika.

Za svoje potrebe kvasac koristi kisik iz šećera prilikom njegove razgradnje:

Disanje (uz prisustvo zraka – aerobno)



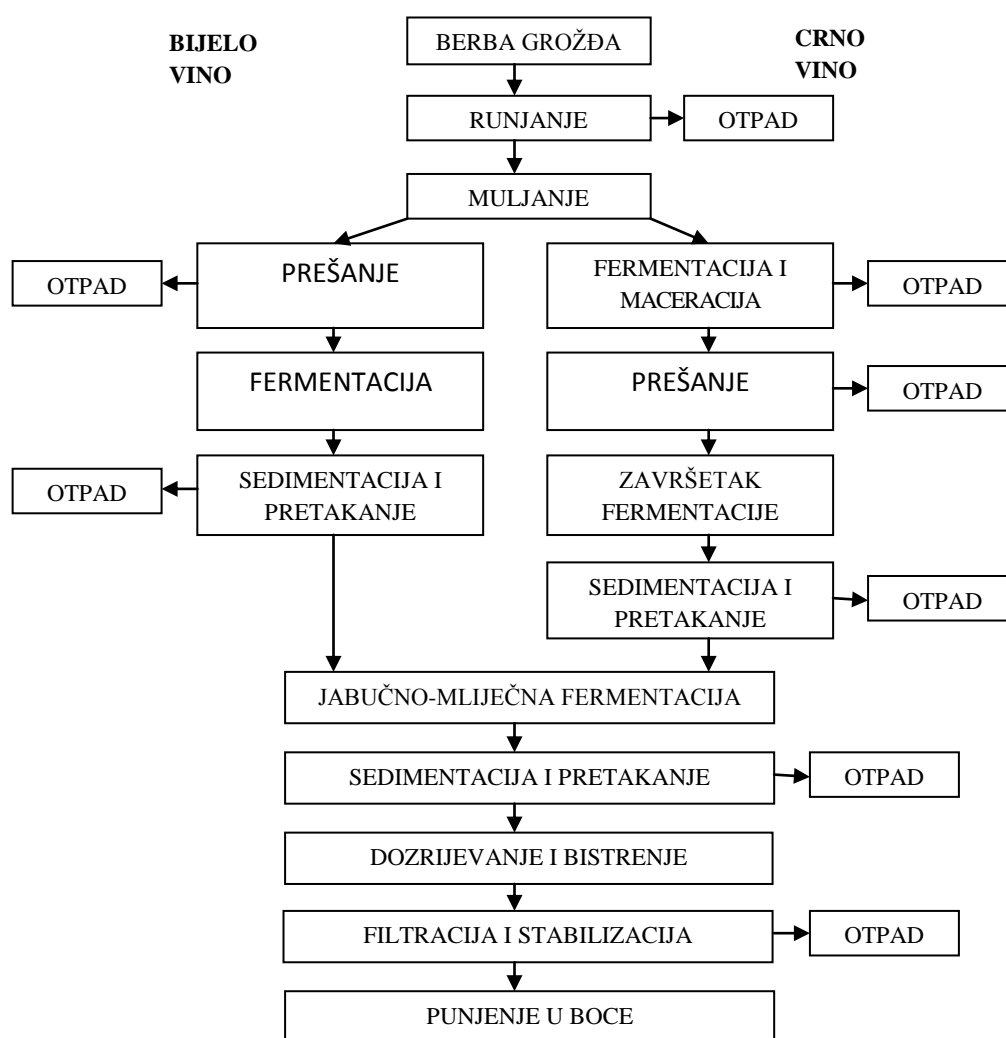
Fermentacija (bez prisustva zraka – anaerobna)



Fermentacija se dijeli na burnu i tihi. Burnu fermentaciju karakterizira istovremena razgradnja velike količine šećera koja nastupa kada se kvasac razmnoži u dovoljnoj količini. Posljedično dolazi do naglog i velikog pada sadržaja šećera, porasta temperature i jakog pjenjenja uslijed oslobađanja velike količine CO_2 . Obično traje 3 – 7 dana, a u slučaju kontrolirane fermentacije i dulje. Nakon burne fermentacije nastupa tiha fermentacija koja je period stišavanja vrenja, kada temperatura znatno pada, a pjenjenje tekućine slabi, jer se oslobađa manje CO_2 . Tiha fermentacija može trajati i do 6 tjedana. Suvremeniji načini fermentacija su usmjerene fermentacije koje se mogu voditi usporeno, sa višom početnom količinom alkohola te kontinuirano. Ako se želi proizvesti vino na ovaj način, mora se izvršiti taloženje mošta na način da se mošt zasumpori i doda mu se određena količina bistrila. Na taj način blokiramo kvasce donesene na grožđu, koji uglavnom ugibaju, a sumporni dioksid i bistrilo ubrzavaju taloženje u moštu prisutnih nečistoća (čestica zemlje, dijelova bobice,

ostataka sredstava za zaštitu, raznih sluzi mošta i dr.). Taloženje uglavnom traje od 10 – 24 sata, a najviše ovisi o temperaturi. Zatim se mošt dekantira i prebacuje u vrionicu uz dodatak selekcioniranih kvasaca.

Proizvodnja crnog vina razlikuje se od proizvodnje bijelog vina kao što je prikazano na Slici 4 (Arvanitoyannis, 2006; Devesa-Rey, 2011). Kod crnih vina, nakon muljanja dobiva se masulj, u kojem je sok pomiješan s kožicama i sjemenkama te se on sumpori. Sumporenje je neophodno, jer je i boja crnih vina podložna oksidaciji, jače se izlučuje i uništavaju se oštene bakterije.



Slika 4. Shema proizvodnje crnog i bijelog vina
(Arvanitoyannis, 2006; Devesa-Rey, 2011)

Nekoliko sati nakon sumporenja masulju se dodaje vinski kvasac. Masulj fermentira u otvorenim posudama kako bi se izvukla boja iz pokožice. Pri tom vrenju najvažnija je povišena temperatura i prisutnost alkohola. Dio vrenja je i postupak maceracije, odnosno, izlučivanja tvari boje iz pokožice, taninskih tvari i minerala koji prelaze u mošt. Vrenje masulja provodi se na nekoliko načina, odnosno, dva osnovna postupka: hladni i toplinski (termički) postupak. Toplinski se radi u većim vinarijama, dok se hladni provodi u vinarijama manjih proizvođača. Taj se postupak može provoditi otvoreno i zatvoreno. Daljnji postupak prerade se provodi isto kao i za proizvodnju bijelog vina.

2.2.7. Jabučno-mliječna fermentacija

Do 4 tjedna nakon alkoholne fermentacije može doći do biološkog smanjenja kiselosti vina tako da mliječno-kisele bakterije *Leuconostoc oenus*, u za njih povoljnim uvjetima, metaboliziraju oporu jabučnu kiselinu u blažu, okusno kvalitetniju mliječnu kiselinu i ugljikov dioksid. Nakon razgradnje jabučne kiseline, vino postaje znatno pikantnijeg i skladnijeg okusa. Smanjenje koncentracije ukupnih kiselina može iznositi 1 – 3g/L, pa i više.

Jabučno-mliječna fermentacija poželjna je u crnim vinima koja dulje dozrijevaju kako bi postigla optimalnu kakvoću, u vinima za šampanjizaciju te bijelim, dobro dozrelim, vinima, kod kojih se traži stanovita osobina starosti.

2.2.8. Pretakanje vina

Pretakanjem se odvaja mlado vino od taloga koji se nakupio na dnu posude. Prvi se pretok preporuča u studenom, nastupom prvih hladnijih dana, drugo početkom siječnja, a treće početkom ožujka. Ukoliko je u vinu ostalo neprovrela šećera, obavlja se naknadno vrenje na način da se uzmuti talog slatkog nepretočenog vina, koje se iza toga obilno zrači pretakanjem za bolje razmnožavanje kvasaca. Naknadna fermentacija može se postići i zagrijavanjem vina uz grijače ili podizanjem taloga sa dna posude kako bi se kvasci aktivirali. Također, može se upotrijebiti zdravo grožđe nekog drugog nepretočenog vina, a koje nije potpuno provrelo ili selekcioniranim vinskim kvascem.

Kada se želi ostaviti određena količina neprovrelog šećera koji vinu daje blaži okus te povećava harmoničnost vina, provrelom se vinu u pripremi dodaje ugušćeni mošt, porijeklom iz istog vinorodnog područja ili zaustavljanjem vrenja u fermentaciji, pazeći pritom da su omjeri šećera, kiselina i alkohola u ravnoteži.

2.2.9. Bistrenje vina

Mnoga vina se pretakanjem ne izbistre dovoljno. Uzrok mutnoće su najrazličitije koloidne čestice, koje lebde u vinu. Upotrebom sredstva za bistrenje postiže se puno veći stupanj bistroće. Postoje kemijska bistrila koja se spajaju s određenim sastojkom vina u netopiv spoj koji se taloži (napr. želatina, bjelance jajeta, mlijeko) i mehanička koja povlače mutež vina sa sobom na dno bačve (kaolin, španjolska zemlja, ugljen, celuloza, vinski talog i dr.).

2.2.10. Filtracija vina

Filtriranje je postupak odstranjivanja nečistoća iz vina zadržavanjem čestica na filtracijskom sloju kroz koji prolazi vino, a odvajanje se može postići zadržavanjem čestica ili apsorpcijom (čestice se zadržavaju zbog privlačenja uslijed razlike električnog naboja). Filtracijom se postiže najbolje bistrenje vina.

2.2.11. Punjenje vina u boce

Nakon završene dorade, stabilizacije i filtracije, slijedi punjenje vina u boce, a proljeće je idealno vrijeme za punjenje kvalitetnih bijelih vina, jer su tada potpuno izražene sortne karakteristike. Boce za punjenje prvo treba namočiti u toploj vodi, zatim isprati četkom u 2 % otopini sode, a nakon toga isprati toplom i hladnom vodom te ih pustiti da se iscijede. Treba koristiti nove plutene čepove, a neposredno prije upotrebe držati ih 10 – 12 sati u hladnoj vodi. Danas se prakticira sterilno punjenje u atmosferi inertnog plina kako bi se eliminirao kisik u boci.

2.3. Biotehnologija kvasaca u prehrambenoj industriji i u industriji pića

Autohtona fermentirana hrana, kruh, sir i vino, proizvode se i koriste tisućama godina u prehrani ljudi te je ustanovljeno da fermentirana hrana doprinosi jednoj trećini hrane u svijetu. Cilj prehrambene tehnologije je poboljšati svojstva sojeva kvasaca i unaprijediti kontrolu procesa, povećati prinos, iskorištenje, kvalitetu, sigurnost i dosljednost konačnog proizvoda (Chapman, 1991).

Dva najpopularnija proizvoda procesa alkoholne fermentacije su vino i pivo. Najkorišteniji sojevi kvasaca u ovim procesima izabrani su zbog njihove uspješne fermentacije. Međutim, uz uobičajenu razgradnju šećera u alkohol i CO₂, metabolizam kvasaca također proizvodi i razne metabolite, uključujući vitamine, antimikrobne komponente, aminokiseline, organske kiseline (limunska kiselina, mliječna kiselina) i tvari arome (esteri i aldehidi). Spomenuti metaboliti uvelike doprinose kvaliteti i karakteru konačnog proizvoda, posebice u vidu arome, okusa i mikrobiološke stabilnosti (Lambrechts i Pretorius, 2000). Znatna količina trenutnih istraživanja u akademskoj zajednici i industriji usmjerena je na primjenu biotehnologije kvasaca u poboljšanju uspješnosti fermentacije te proizvodnju, kvaliteti i prinosu metabolita (Cereghino i Cregg, 1999; Stephanopoulos i sur., 2004). Tradicionalne metode genetičkog inženjerstva, klasična mutageneza i hibridizacija, koriste se kako bi se unaprijedili sojevi kvasaca koji se najviše koriste u pekarskoj industriji te industriji piva i vina (Pretorius i Bauer, 2002). Metode rekombinantne DNA također se koriste u genetičkoj manipulaciji kvascima kako bi se potaknula ekspresija željenih gena, spriječila ekspresija ostalih gena ili se određeni geni inaktiviraju kako se neki metabolički putevi ne bi odvijali. Genetičke manipulacije vinskih kvasaca u svrhu poboljšanog izlučivanja enološki važnih enzima (Malherbe i sur., 2003; Louw i sur., 2006), proizvodnje tvari arome (Lilly i sur., 2006), proizvodnje glicerola (Cambon i sur., 2006), razgradnje malata (Volschenk i sur., 1997) i smanjene proizvodnje etanola (Heux i sur., 2006) pokazale su se kao prihvatljiv pothvat.

Neki genetički modificirani kvasci, prikladni u proizvodnji pekarskih proizvoda, vina i piva, odobreni su za upotrebu iako nijedan od tih sojeva nije komercijalno korišten u prošlosti. Mogućnosti daljnjih, genetički modificiranih kvasaca su nebrojene.

2.4. Sistemska biologija

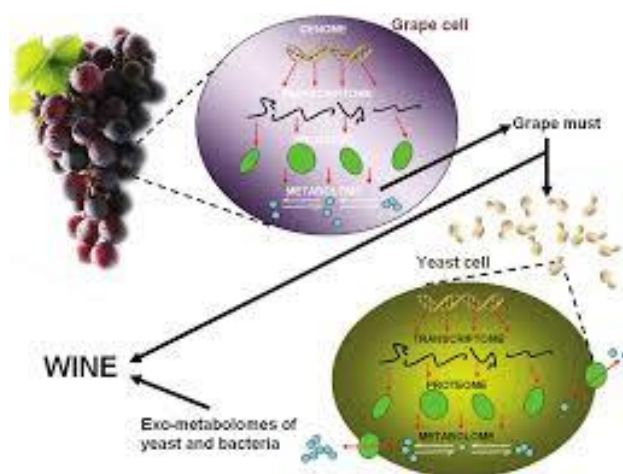
2.4.1. Razvitak sistemske biologije

Tradicionalna znanost o vinogradarstvu te vinarstvu i enologiji sukobljene su sa kompleksnosti procesa te mnoge studije, dok prikazuju posljedice određenih parametara, često ne uspiju identificirati uzrok istih. U samom vinogradu, velik broj parametara utječe na rast i sastav bobice grožđa, posebice okolišni faktori kao što su tlo, zrak, nagib i klima. Ovi čimbenici djeluju zajedno s genetičkim potencijalom sorte grožđa ili individualne biljke. Sa gledišta proizvodnje vina, krajnji mjerodavni rezultat ovih procesa, definiran je kemijskom strukturom grožđa, poznat i kao metabolom grožđa (Driesel i sur., 2003; Cramer i sur., 2007). Tradicionalna istraživanja biologije vinove loze (sa fiziološkog, genetičkog i molekularnog pristupa) pridonijela su uspostavi veze između određenih okolišnih parametara sa sadržajem grožđa i sastavom mošta. Ipak, u cjelini, saznanja o biologiji vinove loze ograničena su zbog nepotpunih molekularnih mapa i nepotpunih saznanja vezanih uz genetičku regulaciju ovih drvenastih biljaka.

Mnogi faktori pridonose ekspresiji metaboloma grožđa te utječu na karakteristike završnog proizvoda. Takvi faktori uključuju tretman grožđa i mošta prije same fermentacije, fizikalne parametre koji prevladavaju tijekom fermentacije te utjecaj istih na dinamički, mikrobni ekosustav koji će se kontinuirano prilagođavati i mijenjati tijekom fermentacije. Ekosustav alkoholne fermentacije obično se sastoji od mnogobrojnih sojeva bakterija mliječne i octene kiseline, kao i široki spektar raznih vrsta kvasaca i plijesni. Sa enološke strane, najvažniji od svih navedenih mikroorganizama je, znanstveno najproučavaniji, kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Taj kvasac se najbolje prilagodio nepovoljnim uvjetima tijekom alkoholne fermentacije kao što su visoki osmotski tlak, niska pH vrijednosti posebice, rastuća koncentracija etanola (Attfield, 1997). Posljedično, većina istraživanja alkoholne fermentacije orijentirana su oko ovog mikroorganizma.

Iako razumijevanje bioloških sustava brzo raste ta znanja su temeljena isključivo na jednostavnim principima sa naglaskom na pojedinačne komponente kao što je pojedinačni gen ili protein unutar biološkog sustava, ali su doprinijela razumijevanju bioloških sustava mapiranjem genetičkih i metaboličkih putova. Međutim i dalje nije moguće razjasniti složene biološke veze koje opisuju žive organizme. U konačnici, složeni sustavi mogu se jedino objasniti složenim, analizama visoke razlučivosti.

Zahvaljujući razvitku novih tehnologija u biološkim i kemijskim znanostima, kao i napretku statističkih i drugih obrada podataka, takve složene analize postale su jedinstvena prilika u razumijevanju bioloških sustava kao cjeline. Ovakav pristup nalazi se pod pojmom „sistemska biologija (biologija sustava)“ što ukazuje da se proučavanju bioloških procesa pristupa sa gledišta cijele stanice ili cijelog organizma te je prikazana Slici 5 (Anonimus 4, 2016). Sistemska biologija je holistički pristup razjašnjenju složenosti bioloških sustava koja počinje od činjenice da je cjelina važnija od zbroja svih njenih dijelova. To je znanstvena disciplina koja integrira mnoga područja, biologiju, računalne znanosti, inženjerstvo, bioinformatiku, fiziku i druge, kako bi predviđela promjene unutar sustava s obzirom na različite uvjete. Mikroorganizam *Saccharomyces cerevisiae* predstavlja glavni modelni organizam molekularnih i staničnih biologa stoga isti služi u naglasku važnosti “omnika” u enologiji.



Slika 5. Sistemska biologija(Anonimus 4, 2016)

2.4.2. Pozadina biologije stanica

Metaboličko inženjerstvo je povezano sa genetičkom strukturom organizama kako bi se postigao određeni fenotip (Bailey, 1991). Stanice se sastoje od složene mreže regulatornih mehanizama koji se odupiru genetičkim promjenama kao što su mutacije koje stvaraju nove putove za kontinuirani, snažan izričaj (Farmer i Liao, 2000). Kontrola metaboličkih procesa kreće od prijenosa informacija sa genoma, preko transkripcije i translacije, do konačnog utjecaja na aktivnost enzima. Međutim, regulacija povratnom spregom prisutna je u mnogim

putovima. „Omničke“ znanosti danas mogu promatrati i analizirati cijele sustave bioloških makromolekula kao što su DNA, RNA, proteini i metaboliti sa gledišta cijele stanice, tkiva, organizma ili populacije (Brown i Botstein, 1999; Bruggeman i Westerhoff, 2007). Iz takvih znanosti razvile su se specijalizirane znanosti, transkriptomika, proteomika i metabolomika, ovisno na kojoj biološkoj razini se određene informacije analiziraju. Dok se većina analiza svodi na kvantifikaciju, neke tehnologije pokušavaju odrediti međudjelovanje pojedinih komponenata (interaktomika) te genetičke i metaboličke putove unutar sustava (fluksomika).

Informacije dobivene iz spomenutih znanosti omogućuju objašnjenje prirodnih bioloških interakcija (Goryanin i sur., 1999). Dobivene informacije mogu se koristiti u matematičkom modeliranju što omogućava računalnu kontrolu procesa te predviđanje odgovora sustava na specifične podražaje (Palsson, 2000; Price i sur., 2003). Velike količine podataka dobivene ovim pristupima zahtijevaju istovremeno unaprjeđenje određenih polja znanosti poznati kao bioinformatika i višestruka analiza podataka (Palsson, 2002; Ge i sur., 2003; Larsson i sur., 2006; Lavine i Workman, 2006).

2.4.3. Genomika

Početna točka svih istraživanja na razini sustava je genom, jer promjene u sekvenci genoma određenog organizma utječu na njegova fenotipska obilježja. Genomsko sekvencioniranje je proces u kojem se cjelokupna DNA određenog organizma određuje odjednom što uključuje kromosomsku DNA kao i mitohondrijsku DNA. Temeljni način izvedbe genetskog sekvencioniranja se promijenio, jer dijelovi gena pružaju mnoge informacije koje se koriste u znanstvene svrhe.

Prvi organizam s potpuno sekvencioniranim genomom je *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau i sur., 1996). To otkriće omogućilo je biologima bolje razumijevanje fiziologije kvasaca na molekularnoj razini. Glavni cilj genomskog sekvencioniranja je identifikacija svih gena u organizmu te su računalne metode identifikacije gena, koji kodiraju za proteine, vrlo razvijene, posebice za zbijene genome kao što je kod *Saccharomyces cerevisiae*, čija je gustoća kodirajućih gena približno 75% (Goffeau i sur., 1996). Zahvaljujući tome, genom laboratorijskog soja S288c vrlo dobro je određen s jasno opisanim kodirajućim i regulatornim regijama te je lako dostupan znanstvenicima.

Sojevi vinskih kvasaca odlikuju se velikom raznovrsnošću veličine i broja kromosoma čime se bitno razlikuju od laboratorijskih sojeva te su također aneuploidi (Bakalinsky i Snow, 1990). Kromosomske promjene uključuju povećanje ili smanjenje broja kromosoma te razne delecije i/ili duplikacije (Adams i sur., 1992; Rachidi i sur., 1999). Nažalost, vrlo malo DNA sekvenci vinskih kvasaca je objavljeno i dostupno u javnim bazama podataka (Masneuf i sur., 1998). Međutim, homologni slijed laboratorijskog soja S288c 99% je sličan onom kod vinskog kvasca što znači da se informacije dobivene iz sekvenci soja S288c mogu upotrijebiti za sistemsku analizu sojeva vinskih kvasaca (Puig i sur., 1998; 2000).

Veliki korak u genomici vinskog kvasca postignut je nedavno kada je australski vinarski istraživački institut (Australian Wine Research Institute) završio sekvencioniranje genoma komercijalnog kvasca soja AWRI1631 (Borneman i sur., 2008). Zanimljivo je da se samo 0,6% spomenutih sekvenci razlikuje od onih u laboratorijskom kvascu S288c te je otkrivena dodatna sekvenca DNA (dovoljna da nosi najmanje 27 gena) kod vinskih kvasaca. Većina sekvenci tih pretpostavljenih gena ne pokazuju sličnost sa genima pronađenim u ostalim sojevima *Saccharomyces*, ali pokazuju sličnost sa genima pronađenim u daljnjim sojevima gljiva. Neki od tih gena specifičnih za vinske kvasce kodiraju za proteine koji su povezani sa staničnom stijenkom što može objasniti preživljavanje vinskih kvasaca u nepovoljnim uvjetima proizvodnje vina. Pojavljuju se, također, i geni koji kodiraju za unos aminokiselina što moguće ukazuje na utjecaj na aromu i okus vina zbog povezanosti metabolizma aminokiselina sa stvaranjem hlapivih tvari arome.

Zahvaljujući razvitku raznih tehnika sekvencioniranja, softverskih alata koji omogućuju automatsko objašnjenje genoma, sve više genoma se sekvencionira i postaje javno dostupno. Tada komparativna genomika omogućava detaljnije objašnjenje genoma, u smislu proizvodnje vina.

2.4.4. Transkriptomika

Kao što je već spomenuto, uobičajeno objašnjenje sustava kreće od genoma, jer na promjene u fenotipu mogu utjecati promjene u genima ili one na razini transkripcije. Nakon sekvencioniranja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* razvijeni su mnogi uređaji za analize temeljeni na znanju genskog sekvencioniranja te funkcionalnih zapažanja iz 90% kodirajućih gena genoma kvasaca. Uslijedio je izazov objašnjenja cjelokupne funkcionalne genomike kao

slijedeći korak u potpunom razumijevanju i objašnjenju fiziologije i metabolizma kvasaca. Funkcionalna genomika je relativno novo područje istraživanja s ciljem određivanja principa ekspresije gena i interakcija unutar genoma. To bi moglo objasniti način na koji kvasci reagiraju na promjene u okolišu na genetičkoj razini te time unaprijediti tehnološke procese promjenom uvjeta u kojima se odvijaju. Kao što je već spomenuto, postoje značajne razlike fermentacijske sposobnosti raznih sojeva vinskih kvasaca u smislu izlučivanja enološki važnih enzima, usporavanja ili zaustavljanja fermentacije, proizvodnje tvari arome te proizvodnje neželjenih okusa. Ukratko, sojevi se drastično razlikuju prema kvaliteti vina kojeg proizvode. Te razlike među sojevima *Saccharomyces cerevisiae* su nasljedne i time genetički određene. Funkcionalna genomika pokazuje potencijal u objašnjenju tih genetičkih razlika dopuštajući nekim sojevima bolju izvedbuu određenim procesima, a nekima ne. Također, ima velike izgleda u definiranju i modificiranju nedostižnih metaboličkih mehanizama kojima se kvasci prilagođavaju na razne uvjete okoliša.

Tehnologija transkriptomike rezultat je međudjelovanja više tehnologija kao što su DNA sekvencioniranje, sinteza oligonukleotida, biokemija fluorescencije te računalna statistika. Sve to omogućuje mjerenje obilja mRNA (Lander, 1999) što objašnjava utjecaj cjelokupnog sustava metaboličke i fiziološke kontrole na transkripciju identifikacijom različito eksprimiranih gena. Prema tome, moguće je promatrati ekspresiju mnogih, ako ne i svih gena istovremeno, uključujući i one sa nepoznatom biološkom funkcijom. Određivanjem sličnosti transkripcije, predviđena je uloga mnogih, nekada neobjašnjenih, gena temeljem pretpostavke da su koeksprimirani geni funkcionalno povezani. Raniji primjer tih pretpostavki bila je identifikacija gena koji su različito eksprimirani u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* kao odgovor na metaboličku zamjenu sa rasta na glukozi na dvostruki rast na glukozi i etanolu (Da Silva i sur., 1997).

Mnoga istraživanja transkriptomike kvasaca provedena su na kemostatskim kulturama koje pokazuju da hranjive tvari koje ograničavaju rast imaju važan utjecaj na cjelokupni transkripcijski odgovor genoma kvasaca na promjene u okolišu (Boer i sur., 2003; Usaite i sur., 2006). Stvaranje profila transkripcije kvasaca koji su izloženi raznim nepovoljnim uvjetima omogućuje detaljnije razumijevanje utjecaja tih promjena na stanicu, na razini transkripcije (Gasch i sur., 2000; Kuhni sur., 2001; Gasch i Werner-Washburne, 2002). Ovi primjeri učestalih promjena i karakterizacije sistemskog fenotipa (na razini ekspresije gena) pružili su mnoštvo uvida u stanicu te time unaprijedili mikrobnu biologiju. Također, objavljena su neka istraživanja transkriptomike povezana sa sojevima vinskih kvasaca

(Erasmus i sur., 2003; Rossignol i sur., 2003; Varela i sur., 2005; Mendes-Ferreira i sur., 2007; Marks i sur., 2008; Pizarro i sur., 2008; Rossouw i sur., 2008). Ta istraživanja pobliže su prikazala genetičke i regulatorne mehanizme uključene u fermentaciju što je omogućilo bolje razumijevanje tog važnog procesa. Primjerice, Pizarro i sur., (2008) su prikazali kako porast temperature i ograničenje dušika utječe na razne fiziološke i transkripcijske odgovore u laboratorijskim i vinskim sojevima kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Otkriveno je da je metabolizam vinskih kvasaca neustaljen što objašnjava kompetitivnu prednost vinskih sojeva kvasaca u stvarnoj fermentaciji vina. Time je objašnjena sposobnost vinskih kvasaca da se razmnožavaju i proizvode više prinose biomase na niskim temperatura i to s istom količinom dušika u usporedbi sa laboratorijskim kvascima.

2.4.5. Proteomika

Proteomika je grana znanosti kojoj je cilj karakterizirati i identificirati sve proteine i interakcije između proteina u određenoj vrsti (Hartwell i sur., 1999; Ideker i sur., 2001a). Povećanom razinom transkripcije ne može se dokazati doprinos kodirajućih proteina staničnom odgovoru u neposrednoj eksperimentalnoj analizi. Iako ekspresija gena nije direktno povezana sa ekspresijom proteina (Ideker i sur., 2001b), proteinski produkti gena koji su koekspimirani pod različitim uvjetima često su funkcionalno međusobno povezani kao dio istog puta ili kompleksa (Grigoriev, 2001; Ge i sur., 2001). Uzimajući u obzir da razine transkripcije nisu direktno povezane sa količinom proteina i *in vivo* putovima (Griffin i sur., 2002; Washburn i sur., 2002; Daran-Lapujade i sur., 2004), opširne baze podataka transkriptomike moraju se kombinirati i usporediti sa ostalim podsustavima podataka kako bi zajedničke informacije pružile bolje i značajnije informacije o željenom sustavu (Tong i sur., 2002). Kombinirajući mnoga saznanja stanične i molekularne biologije kao što je količina proteina i ekspresija transkripcije, omogućava se konstrukcija točne i cjelovite stanične mape (Walhout i sur., 2002).

Određivanje genomske baze proteina nije još izvedivo, ali su razvijene metode za određivanje relativnih količina proteina između uzoraka (Smolka i sur., 2002). Konvencionalna kvantitativna analiza proteoma primjenjuje dvodimenzionalnu (2D) gel elektroforezu (O'Farrell, 1997) za razdvajanje smjese složenih proteina nakon čega slijedi razgradnja u gelu te masena spektrometrija za identifikaciju proteina. Više od 1500 topivih proteina kvasaca otkriveni su i vrlo dobro izolirani dvodimenzionalnim gelom. Ova tehnika

omogućuje otkrivanje promjena u sintezi proteina, modifikacije proteina te degradacije do kojih dolazi uslijed okolišnih ili genetičkih promjena. Nedostaci ove metode su nemogućnost identifikacije većine proteina sa proteinske mape kvasaca, slaba dosljednost podataka, teža detekcija slabo zastupljenih i hidrofobnih proteina te slaba dinamička razina detekcije (Fey i Larsen, 2001; Rabilloud, 2002).

Kako bi se prevladali spomenuti nedostaci, kromatografija visoke razlučivosti u kombinaciji sa masenom spektrometrijom može se koristiti za brzu i točnu identifikaciju proteina dok god protein/i već postoji/e jedinstveno u bazi podataka (Mann i sur., 2001). Najčešće korišten pristup sa visokorazdjelnom tekućinskom kromatografijom (HPLC) za separaciju peptida od proteina dobivenih iz kompleksnih proteoma je 2D nano-tekućinska kromatografija i masena spektrometrija (LC/MS). Ovim pristupom, u prvom dijelu, koristi se kolona sa jakim izmjenom kationa (SCX), a slijedi ju kolona obrnutih faza (RP) (Nägele i sur., 2004). Ukupno je 1504 kvašćevih proteina nedvosmisleno identificirano u jednoj analizi korištenjem 2D kromatografije s dvostrukom masenom spektrometrijom (MS/MS) (Peng i sur., 2002).

Zabilježeni su prvi napretci proteomike fermentirajućih kvasaca, obično vezani sa transkriptomičkim ili metabolomičkim analizama (Brejning i sur., 2005; Salvadó i sur., 2008). Ova istraživanja objasnila su faze rasta fermentirajućih kvasaca te predložila nove metode industrijske primjene. Proteomička istraživanja o tome kako kvasci reagiraju na razne promjene u okolišu također su poboljšala saznanja o funkcionalnim modulima uključenim u kvašćev odgovor na specifične okolišne faktore (Vido i sur., 2001; Kolkman i sur., 2006). Primjerice, Kolkman i sur. (2006) je usporedio kvašćeve odgovore na uvjete kada je dušik ograničavajući faktor te kada je ugljik: usporedba razine transkripcije i proteina pokazala je da je porast razine proteina tijekom limitacije glukoze većinom transkripcijski kontroliran, a doregulacija proteina tijekom limitacije dušika primarno je kontrolirana na posttranslacijskoj razini povećanom translacijskom uspješnosti i /ili smanjenom degradacijom proteina.

2.4.6. Metabolomika

Karakterizacija fenotipa vrste primarno se oslanja na mnoštvo transkripata i količine proteina. Tek se rijetko manji metaboliti uključuju u analize sustava zbog poteškoća u uzorkovanju i analiziranju spomenutih molekula. Veliki problem čine brze promjene ili

oscilacije u količini metabolita u metaboličkom putu, čak i kada je taj put uravnotežen i neometan. Manje molekule također sadrže širi spektar kemijskih karakteristika nego primjerice RNA transkripti te se teže istovremeno mjere (Dettmer i sur., 2006).

Unatoč svim, već navedenim, poteškoćama, napredci u visokorazdjelnim metodama analize analitičke kemije omogućuju otkrivanje i relativnu kvantifikaciju velikog broja metabolita istovremeno (Dunn i Ellis, 2005; Smedsgaard i Nielsen 2005; Villas Bôas i sur., 2005). Plinska kromatografija zajedno s masenom spektrometrijom omogućuje visokorazdjelne analize u relativno kratkom vremenu i uz prilično nisku cijenu. Plinska kromatografija odjeljuje metabolite dok masena spektrometrija identificira i kvantificira metabolite s obzirom na odgovarajući pik standarda na grafu. Specifično, kemijske analize vina postigle su izvanredan napredak tijekom posljednjeg desetljeća te je sada moguće kvantificirati veliki broj kemijskih komponenti (hlapivih i nehlapivih) sa značajnom točnošću (Villas Bôas i sur., 2005). Osim plinske ili tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (GCMS ili LCMS), razvojem dvodimenzionalnih tehnika povećana je djelotvornost razdvajanja i uspješnost uključujući spojeve raznih fizikalno-kemijskih svojstava u jednu analizu spojeva (Adahchour i sur., 2006; Campo i sur., 2006).

Metaboliti su ključni regulatori stanične homeostaze te time promjene količine specifičnih grupa metabolita mogu se objasniti kao odgovor sustava na promjene u okolišu. Zbog toga njihovo proučavanje pruža važan korak u shvaćanju i karakterizaciji složenih fenotipova kao i identifikaciju biomarkera za specifične fiziološke odgovore. Testiranje stanja metabolita predstavlja priliku za identifikaciju raznovrsnijih skupova aktivnih molekularnih veza, posebice u smislu jake regulacije transkripcijskih i translacijskih procesa određenim metabolitima. Metabolički profili mogu definirati okosnicu procesa koji se javljaju kao odgovor na razvojne, genetičke ili okolišne učinke te su time korisni u definiranju staničnog fenotipa (Allen i sur., 2003). Metaboličke informacije također mogu biti unesene u baze podataka koje integriraju transkripciju, proteinske interakcije i metaboličke aktivnosti kako bi se odredilo cjelokupni profil staničnog odgovora.

Jasnija karakterizacija metaboličkog stanja fermentirajućeg kvasca trebala bi omogućiti bolje razumijevanje reakcija između različitih putova te može unaprijediti identifikaciju ključnih staničnih mehanizama (Çakir i sur., 2006). Zadnjih nekoliko godina raste broj metabolomičkih istraživanja na kvascima (Daran-Lapujade i sur., 2004; Beltran i sur., 2006; Kresnowati i sur., 2006; Villas-Bôas i sur., 2007) kojima su pruženi bolji uvidi u

molekularne procese povezane s odgovorima kvasaca na okolišne faktore kao što su temperatura fermentacije i dostupnost supstrata ugljikom. Primjerice, Kresowati i sur. (2006) ukazali su da unatoč prestanku limitacije glukozom stanična homeostaza je uspostavljena značajnim porastom količine trehaloze-6-fosfata nakon čega je uslijedila usklađena povratna regulacija tri gena koji kodiraju za heksokinazu kako bi se spriječila „smrt ubrzana glukozom“. Uslijedila je trenutna prilagodba količine fruktoza-2,6-difosfata time dokazujući da se stanični mehanizmi odgovorni za prilagodbu razine metabolita nalaze u središnjem metabolizmu ugljika.

2.4.7. Fluksomika

Još jedna važna prepreka racionalnoj optimizaciji kvasca za industrijsku primjenu je nedostatak pouzdanog, sveobuhvatnog metaboličkog modela koji bi sadržavao većinu stehiometrijskih, kinetičkih i regulatornih učinaka na unutarnje konverzije metabolita i odvijanje metaboličkog puta tijekom mreže staničnih reakcija (Edwards i Palsson, 2000). Kako bi se u potpunosti shvatio metabolizam bilo koje stanice/tkiva/organizma trebaju se proučavati i metaboliti i njihovi metabolički putovi. Definiranje metaboličkog puta predstavlja najvažniju komponentu pri određivanju vrste za metaboličko inženjerstvo (Stephanopoulos i sur., 2004). Razvijene su nove metode za mjerenje metaboličkih putova temeljem tehnologije NMR i MS čime se provode točna mjerenja visoke razlučivosti korištenjem supstrata označenih radiozračenjem (Szyperski, 1998; Christensen i Nielsen, 1999). U ovim metodama se ^{13}C -označeni supstrat ugrađuje u stanicu kako bi se pratilo odvijanje metabolizma (Wiechert, 2001). Uska povezanost različitih dijelova metabolizma znači da se promjene unutar puta jednog dijela metabolizma širi na mnoge druge povezane dijelove (Nielsen, 2003). Na taj način razvitkom potrebnih matematičkih modela, mjerenja čak samo nekoliko metaboličkih putova mogu pružiti značajne informacije povezane sa cjelokupnom metaboličkom mrežom (Wiechert i sur., 1997).

Metaboličkim putovima može se objasniti fenotip i protok ugljika u sustavu s obzirom na bilo kakvu promjenu (Nielsen, 2003) što se primjenjuje u metaboličkom inženjerstvu i sistemskoj biologiji kvasaca. Modeliranjem metaboličkog puta može se odrediti genomska stanična svojstva metabolizma određenog organizma te nadalje olakšati konstrukcija modela temeljem „omničkih“ podataka (Sauer, 2004). Na primjer, razvijeni su modeli sa ograničenim mrežama koristeći reakcijsku stehiometriju (Reed i Palsson, 2003). Ovakvi modeli sastavljeni

su povezivanjem metabolita i reakcija u kojima sudjeluju kako bi se formirao metabolički graf koji se zatim koristi za optimizaciju reakcijskih putova sa specifičnom ciljnom funkcijom (na primjer biomasa ili tvorba fermentirajućih produkata). Genomski modeli su također razvijeni i za kvasce (Forster i sur., 2003a; Duarte i sur., 2004), što znači da se predviđanja ugljikovog metaboličkog puta mogu povezati sa ostalim „omničkim“ podacima u interpretacijske svrhe i daljnji razvitak strategija metaboličkog inženjerstva.

2.4.8. Interaktomika

U konačnici, sistemska biologija suočena je sa impresivnim zadatkom interpretiranja i povezivanja različitih skupova bioloških podataka sa različitih razina 'omničkih' istraživanja kako bi se razjasnili mehanizmi složenih bioloških pojava. Usporedbom kvašćevih transkriptoma i proteoma u različitim uvjetima kultivacije pokazalo se da je višestupanjska analiza nužna za sistemska biologiju kvasaca (Kolkman i sur., 2006) kako bi se izbjeglo moguće gubljenje uzročno-posljedične veze sa drugih stadija koji utječu na sustav u cjelini.

Značajniji napredci u sekvencioniranju genoma, transkripciji te proteinskom i metaboličkom profiliranju nisu uvijek našli uspješnu primjenu u metaboličkom metabolizmu kvasaca i drugih mikrobnih sustava. Razlog tomu je nemogućnost potpunog prevođenja velikih baza podataka u smisleni model koji objašnjava kako komponente zajedno funkcioniraju pri izvedbi određenog događaja u stanici (Vemuri i Aristidou, 2005). Analize komparativne transkriptomike i egzometabolomike uspješno predviđaju utjecaj promjena na razini ekspresije pojedinačnih gena na složenu mrežu putova koji proizvode tvari arome (Rossouw i sur., 2008). Završna komponenta uspješnih istraživanja sistemske biologije nalazi se u području interaktomike koja nastoji, pomoću matematičkog modeliranja i simulacije, spojiti informacije iz različitih faza analize (De Jong, 2002).

Računalni stanični modeli postali su neizostavni pri analizi složenih bioloških sustava. Razne statističke metode povezuju velike baze podataka i fenotipove. Uz dovoljno podataka moguće je sastaviti modele vjerojatnosti koji bi teoretski prikazivali stanične interakcije (Jeong i sur., 2000; De Jong i sur., 2003). Stvaranjem spomenutih staničnih modela, stvorena je sveobuhvatna mreža molekulskih interakcija čime je otkrivena hijerarhija regulatornih i metaboličkih putova.

Stanice kvasaca su složena mreža molekularnih i okolišnih međudjelovanja koji zajedno čine vrlo složen fenotip. Za razumijevanje međudjelovanja kvasaca i sastojaka u moštu te kako međusobno djeluju tijekom fermentacije, potrebno je shvaćanje funkcionalnih posljedica biomolekularnih interakcija koje se javljaju u kvascima. Unatoč ograničenom znanju o regulatornim sustavima, „omničke“ metode visoke razlučivosti u mogućnosti su obznaniiti takve informacije. Točnije, baze podataka komparativnih mikročipova u kombinaciji sa postojećim modelima kvašćevog metabolizma i mreže interakcija potencijalno mogu računalno procijeniti biološki značajne promjene u ekspresiji gena u ključnim dijelovima metabolizma (Forster i sur., 2003b; Patil i Nielsen, 2005). Ovaj pristup je jedan od tek nekoliko dostupnih višestupanjskih analiza koje se primjenjuju na fermentirajuće kvasce te pokazuju veliki potencijal u razjašnjavanu znanstveno važnih pitanja.

2.5. Sistemska biologija i biotehnologija

Razvitak sistemske biologije veliki je pomak za biotehnologe. Preokret je tosa redukcinističkog pristupa molekularne biologije na novi pristup vođen sveobuhvatnim gledištem koji daje nove ideje dizajniranja i provedbe biotehnoloških pristupa. Tehnologije visoke razlučivosti poslije genomičkog razdoblja uspješno su formirale velike količine, dosad, neistraženih baza podataka. Sistemska biologija bi mogla povezati sve dostupne informacije u zajedničke modele koji bi olakšali otkriće novih antibiotika i metaboličko inženjerstvo, dva glavna područja moderne biotehnologije.

Nedvojbeno postoji velika potreba za novim pristupima koji bi zamijenili starije metode pokušaja i pogrešaka pri razvoju bioprocasa i bioprodukta. U posljednjem desetljeću pojavile su se poneke tvrtke koje se bave sistemskom biologijom, većinom s ciljem razvitka novih antibiotika. Svjetske biotehnološke tvrtke kao što je Novartis također su prigrllile sistemsku biologiju kao dio svog interesa (Mack, 2004). Korištenjem pristupa sistemske biologije, uhodane farmaceutske tvrtke su drastično smanjile vrijeme trajanja razvitka antibiotika za dijabetes, pretilost, artritis, astmu, neke vrste tumora i još puno unosnih vrsta bolesti. Osim zdravlja, veliki potencijal za ubrzan uspjeh imaju i metabolički inženjeri.

Sistemska se biologija također može koristiti u grani biotehnologije koja se bavi unaprjeđenjem sojeva (Stephanopoulos i sur., 2004). Kako bi se uspješno objasnila složenost stanice za unaprjeđenje sojeva potrebno je usklađeno razumijevanje više staničnih procesa.

Napredak tog područja je ovisan o razvitku teorijskih mapa koje olakšavaju shvaćanje molekulskih mehanizama i identifikaciju područja za genetičku modifikaciju. Razvitak sojeva predstavlja dostižan cilj sistemske biologije, posebice u kombinaciji sa genetičkim metodama kao što su višestruke ekspresije kvasaca te mape delecije. Sojevi se mogu mijenjati provedbom specifičnih promjena u prijenosu, pretvorbi ili regulaciji koje bi rezultirale preraspodjelom putova i poboljšanom proizvodnjom željenih spojeva ili promijenjenom fiziologijom sojeva. Inovativne tehnike važnih tehnologija mogu ubrzati promjene na sojevima kvasaca koji se koriste u industriji proizvodnje vina.

3. ZAKLJUČCI

Budući ciljevi:

- Cilj enologije je spajanje više znanstvenih disciplina, a ključne su biološke, kemijske, ekološke, geološke i senzoričke znanosti, kao i određenih dijelova procesnog i kemijskog inženjerstva. Kao što je poznato, proces proizvodnje vina sa agrikulturne i industrijske strane uključuje mnoštvo povezanih faktora koji su većinom slabo razjašnjeni i još slabije kontrolirani.
- Sistemska biologija predstavlja najnoviji izazov znanosti. Kako bi imala koristi od dosadašnjih i budućih znanstvenih postignuća, enologija bi treba prigrлити „omničke“ znanosti i uklopiti ih u standardna istraživanja.
- Holistički pristup, za razumijevanje složenih metaboličkih i regulatornih fenomena koji opisuju žive sustave, nedvojbeno će otkriti mnoge nepoznate interakcije između gena, proteina i metabolita, olakšavajući time napredak procesa proizvodnje i novih biotehnoloških pristupa koji će smanjiti trenutna ograničenja rasta grožđa i proizvodnje vina.
- Velike su mogućnosti korištenja genetički modificiranog kvasca u proizvodnji vina, jer bi se potrošačima ukazalo na organoleptičke, zdravstvene i ekonomske prednosti takvih sojeva, a vina bi imala širi spektar okusa.

4.LITERATURA

- Anonimus 1, (2016)
[http://www.veleri.hr/files/datoteke/nastavni_materijali/k_vinarstvo_1/3 -
_Vinifikacija_sa_presama.pdf](http://www.veleri.hr/files/datoteke/nastavni_materijali/k_vinarstvo_1/3_-_Vinifikacija_sa_presama.pdf) (Pristupljeno, 25. 7. 2016.)
- Anonimus 2, (2016)
http://www.krizevci.net/vinograd/htm/pod_strojeви_i_naprave_u_podrumu.html
(Pristupljeno 25. 7. 2016.)
- Anonimus 3, (2016) <http://winemaking.jackkeller.net/wineblog22.asp> (Pristupljeno 31.
7. 2016.)
- Anonimus 4, (2016)
[https://www.researchgate.net/publication/50926132_Wine_Science_in_the_Omics_Er
a_The_Impact_of_Systems_Biology_on_the_Future_of_Wine_Research](https://www.researchgate.net/publication/50926132_Wine_Science_in_the_Omics_Era_The_Impact_of_Systems_Biology_on_the_Future_of_Wine_Research) (Pristupljeno
1. 8. 2016.)
- Adahchour, M., Beens, J., Vreuls, R.J., Brinkman U.A. (2006) Recent developments
in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) IV. Further
applications, conclusions and perspectives. Trends Anal. Chem., **25**, 821–840.
- Adams, J., Puskas-Rozsa, S., Simlar, J., Wilke, C.M., (1992) Adaptation and major
chromosomal changes in population of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Biol. **22**, 13-
19.
- Allen J., Davey, H.M., Broadhurst, D., Heald, J.K., Rowland, J.J., Oliver, S.G., Kell,
D.B.,(2003) High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics
using metabolic footprinting. Nat. Biotechnol. **21**, 692-696.
- Arvanitoyannis, I.S., Ladas, D., Mavromatis, A., (2006) Review: Wine waste
treatment methodology. Int. J. Food Sci. Technol. **41**, 1117-1151.
- Attfield, P.V., (1997) Stress tolerance: the key to effective strains of baker's yeast.
Nat. Biotechnol. **15**, 1351-1357.
- Bailey, J., (1991) Towards a science of metabolic engineering. Science **252**, 1668–
1675.
- Bakalinsky, A.T., Snow, R., (1990) The chromosomal constitution of wine strains of
Saccharomyces cerevisiae. Yeast **6**, 367– 382.
- Beltran, G., Novo, M., Leberre, V., Sokol, S., Labourdette, D., Guillamon, J-M., Mas,
A., François, J., Rozes, N., (2006) Integration of transcriptomic and metabolic
analyses for understanding the global response of low-temperature winemaking
fermentations. FEMS Yeast Res. **6**, 1167-1183.

- Boer, V.M., de Winde, J.H., Pronk, J.T., Piper, M.D., (2003) The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus or sulfur. *J. Biol. Chem.* **278**, 3265-3274.
- Borneman, A.R., Forgan, A., Pretorius, I.S., Chambers, P.J., (2008) Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *FEMS Yeast Res.* **8**, 1185-1195.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E. (1996), Principles and practices of winemaking, Chapman and Hall, International Thomson Publishing, New York.
- Brejning, J., Arneborg, N., Jespersen, L., (2005) Identification of genes and proteins induced during the lag and early exponential phase of lager brewing yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 261-271.
- Brown, P.O., Botstein, D., (1999), Exploring the new world of the genome with microarrays. *Nat. Genet.* **21**, 33-37.
- Bruggeman, F.J., Westerhoff, H.V., (2007) The nature of systems biology. *Trends Microbiol.* **15**, 45–50.
- Çakır, T., Patil, K.R., Önsan, Z.I., Ülgen, K.O., Kirdar, B., Nielsen, J., (2006) Integration of metabolome data with metabolic networks reveals reporter reactions. *Mol. Systems Biol.* **2**, 50.
- Cambon, B., Monteil, V., Remize, F., Camarasa, C., Dequin, S., (2006) Effects of GPD1 overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking ALD6 genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4688–4694.
- Campo, E., Ferreira, V., Lopez, R., Escudero, A., Cacho, J., (2006) Identification of three novel compounds in wine by means of a laboratory-constructed multidimensional gas chromatographic system. *J. Chrom. A.* **1122**, 202–208.
- Cereghino, G.P., Cregg, J.M., (1999) Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 422-427.
- Chapman, J.W., (1991) The development and use of novel yeast strains for food and drink manufacture. *Trends Food Sci. Technol.* **2**, 176-180.
- Christensen, B. i Nielsen, J., (1999) Isotopomer analysis using GC-MS. *Metab. Eng.* **1**, 282-290.

- Cramer, G.R., Ergül, A., Grimplet, J., Tillett, R.L., Tattersall, E.A., Bohlman, M.C., Vincent, D., Sonderegger, J., Evans, J., Osborne, C., Quilici, D., Schlauch, K.A., Schooley, D.A., Cushman, J.C., (2007) Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct. Integr. Genomics* **7**, 111–134.
- Daran-Lapujade, P., Jansen, M.L., Daran, J.M., Van Gulik, W., De Winde, J.H., Pronk, J.T., (2004) Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. *J. Biol. Chem.* **279**, 9125-9138.
- Da Silva, F.G., Iandolino, A., Al-Kayal, F., Bohlmann, M.C., Cushman, M.A., Lim, H., Ergul, A., Figueroa, R., Kabuloglu, E.K., Osborne, C., Rowe, J., Tattersall, E., Leslie, A., Xu, J., Baek, J., DeRisi, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O., (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**, 680–686.
- De Jong, H., (2002) Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a literature review. *J. Comput. Biol.* **9**, 69–105.
- De Jong, H., Geiselman, J., Hernandez, C., Page, M., (2003) Genetic Network Analyzer: Qualitative simulation of genetic regulatory networks. *Bioinformatics* **19**, 336-344.
- Dettmer, K., Aronov, P.A., Hammock, B.D., (2006) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Revs* **26**, 51-78.
- Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alenda, J.L., Barral, M.T., Cruz, J.M., Moldes, A.B., (2011) Valorization of winery waste vs cost of not recycling. *Waste Management* **31**, 2327-2335.
- Driesel, A., Lommele, A., Drescher, B., Topfer, R., Bell, M., Cartharius, I., Cheutin, N., Huck J-F., Kubiak, J., Regnard, P., (2003) Towards the transcriptome of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *Acta Hort.* **603**, 239–250.
- Duarte, N.C., Herrgård, M.J., Palsson, B.O., (2004) Reconstruction and validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a fully compartmentalized genome-scale metabolic model. *Genome Res.* **14**, 1298-1309.
- Dunn, W.B., Ellis, D., (2005) Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends Anal. Chem.* **24**, 285–294.

- Edwards, J.S., Palsson, B.O., (2000) The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: Its definition, characteristics, and capabilities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5528-5533.
- Erasmus, D.J., Van der Merwe, G.K., Van Vuuren, H.J.J., (2003) Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Res.* **3**, 375–399.
- Farmer, W.R., Liao, J.C., (2000) Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. *Nat. Biotechnol.* **18**, 533–537.
- Fey, S.J., Larsen, P.M., (2001) 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis. *Curr Opin. Chem. Biol.* **5**, 26-33.
- Forster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B.O., Nielsen, J., (2003a) Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res.* **13**, 244–253.
- Forster, J., Famili, I., Palsson, B.O., Nielsen, J., (2003b) Large-scale evaluation of in silico gene deletions in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS* **7**, 193–202.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O., (2000) Genomic expression changes in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241-4257.
- Gasch, A.P., Werner-Washburne, M., (2002) The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct. Integr. Genomics* **2**, 181-192.
- Ge, H., Liu, Z., Church, G.M., Vidal, M., (2001) Correlation between transcriptome and interactome mapping data from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Genet.* **29**, 482-486.
- Ge, H., Walhout, A.J., Vidal, M., (2003) Integrating ‘omic’ information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet.* **19**, 551-560.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**, 563-567.
- Goryanin, I., Hodgman, T.C., Selkov, E., (1999) *Bioinformatics* **15**, 749-758.
- Gregoriev, A., (2001) A relationship between gene expression and protein interactions on proteome scale: analysis of the bacteriophage T7 and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* **29**, 3513-3519.

- Griffin, T.J., Gygi, S.P., Ideker, T., Rist, B., Eng, J., Hood, L., Aebersold, R., (2002) Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Proteomics* **1**, 323-333.
- Hartwell, L.H., Hopfield, J.J., Leibler, S., Murray, A.W., (1999) From molecular to modular cell biology. *Nature* **402**, C47-C52.
- Heux, S., Sablayrolles, J.M., Cachon, R., Dequin, S., (2006) Engineering a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast that exhibits reduced ethanol production during fermentation under controlled microoxygenation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5822–5828.
- Ideker, T., Galitski, T., Hood, L., (2001a) A new approach to decoding life: systems biology. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2**, 343-372.
- Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J.A., Christmas, R., Christmas, R., Buhler, J., Eng, J.K., Bumgarner, R., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Hood, L., (2001b) Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* **292**, 929-934.
- Jeong, H., Tombor, B., Albert, R., Oltvai, Z.N., A-L, Barabasi, (2000) The largescale organization of metabolic networks. *Nature* **407**, 651-654.
- Kolkman, A., Daran-Lapujade, P., Fullaondo, A., Olsthoorn, M.M.A., Pronk, J.T., Slijper, M., Heck, A.J.R., (2006) Proteome analysis of yeast response to various nutrient limitations. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006-2026.
- Kuhn, K.M., DeRisi, J.L., Brown, P.O., Sarnow, P., (2001) Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 916-927.
- Kresnowati, M.T., van Winden, W.A., Almering, M.J., Ten Pierick, A., Ras, C., Knijnenburg, T.A., Daran-Lapujade, P., Pronk, J.T., Heijnen, J.J., Daran, J.M., (2006) When transcriptome meets *metabolome*: fast cellular responses of yeast to sudden relief of glucose limitation. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 49-54.
- Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., (2000) Yeast and its importance to wine aroma. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 97-129.
- Lander, E.S., (1999) Array of hope. *Nat. Genet.* **21**, 3–4.
- Larsson, O., Wennmalm, K., Sandberg, R., (2006) Comparative microarray analysis. *OMICS* **10**, 381–397.

- Lavine, B., Workman, J., (2006) Chemometrics. Anal. Chem. **78**, 4137–4145.
- Lilly, M., Bauer, F.F., Styger, G., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., (2006) The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. FEMS Yeast Res. **6**, 726–743.
- Louw, C., La Grange, D., Pretorius, I.S., Van Rensburg, P., (2006) The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavour. Biotechnol. **125**, 447–461.
- Mack, G.S., (2004) Can complexity be commercialized? Nat. Biotechnol. **22**, 1223–1229.
- Malherbe, D.F., Du Toit, M., Cordero Otero, R.R., Van Rensburg, P., Pretorius, I.S., (2003) Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. Appl. Microbiol. Biotechnol. **61**, 502–551.
- Mann, M., Hendricksen, R.C., Pandey, A., (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. Annu. Rev. Biochem. **70**, 437–473.
- Marks, V.D., Ho Sui, S.J., Erasmus, D., van den Merwe, G.K., Brumm, J., Wasserman, W.W., Bryan, J., van Vuuren, H.J.J., (2008) Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. FEMS Yeast Res. **8**, 35–52.
- Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J., Dubourdieu, D., (1998) New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. Appl. Environ. Microbiol. **64**, 3887–3892.
- Mendes-Ferreira, A., del Olmo, M., Garcia-Martinez, J., Jimenez-Marti E, Mendes-Faia A., Perez-Ortin, J.E, Leao, C., (2007) Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to different nitrogen concentrations during alcoholic fermentation. Appl. Environ. Microbiol. **73**, 3049–3060.
- Muštović, S. (1985), Vinarstvo sa enohemijom i mikrobiologijom, Privredni pregled, Beograd.
- Nägele, E., Vollmer, M., Hörth, P., (2004) Improved 2D nano-LC/MS for proteomics applications: A comparative analysis using yeast proteome. J. Biomol. Techn. **15**, 134–143.
- Nielsen, J., (2003) It's all about metabolic fluxes. J. Bacteriol. **185**, 7031–7035.

- O'Farrell, P.H., (1997) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
- Palsson, B.O., (2000) The challenges of in silico biology. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1147-1150.
- Palsson, B.O., (2002) In silico biology through 'omics'. *Nat. Biotechnol.* **20**, 649-650.
- Patil, K.R., Nielsen J., (2005) Uncovering transcriptional regulation of metabolism by using metabolic network topology. *PNAS* **102**, 2685-2689.
- Peng, J., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Licklider, L.J., Gygi, S.P., (2002) Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: The yeast proteome. *J. Proteome Res.* **2**, 43-50.
- Pizarro, F.J., Jewett, M.C., Nielsen, J., Agosin, E., (2008) Growth temperature exerts differential physiological and transcriptional responses in laboratory and wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6355-6368.
- Pretorius, I.S., Bauer, F.F., (2002) Meeting the consumer challenge through genetically customised wine yeast strains. *Trends Biotechnol.* **20**, 426-432.
- Price, N.D., Papin, J.A., Schilling, C.H., Palsson, B., (2003) *Trends Biotechnol.* **21**, 162-169.
- Puig, S., Ramón, D., Pérez-Ortín, J.E., (1998) Optimized method to obtain stable food-safe recombinant wine yeast strains. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1689-1693.
- Puig, S., Pérez-Ortín, J.E., (2000) Stress response and expression patterns in wine fermentation of yeast genes induced at the diaxial shift. *Yeast* **16**, 139-148.
- Rabilloud, T., (2002) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs the mountains. *Proteomics* **2**, 3-10.
- Rachidi, N., Barre, P., Blondin, B., (1999) Multiple Ty-mediated chromosomal translocation lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 841-850.
- Reed, J.L., Palsson, B.O., (2003) Thirteen years of building constraint-based in silico models of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**, 2692-2699.
- Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A., Blondin, B., (2003) Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast* **20**, 1369-1385.

- Rossouw, D., Naes, T., Bauer, F.F., (2008) Linking gene regulation and the exometabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics* **9**, 530-549.
- Salvadó, Z., Chiva, R., Rodriguez-Vargas, S., Rández-Gil, F., Mas, A., Guillamón, J.M., (2008) Proteomic evolution of a wine yeast during the first hours of fermentation. *FEMS Yeast Res.* **8**, 1137-1146.
- Sauer, U., (2004) High-throughput phenomics: experimental methods for mapping fluxomes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 58–63.
- Smolka, M., Zhou, H., Aebersold, R., (2002) Quantitative protein profiling using two-dimensional gel electrophoresis, isotope-coded affinity tag labeling, and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 19-29.
- Stephanopoulos, G., Alper, H., Moxley J.F., (2004) Exploiting biological complexity for strain improvement through systems biology. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1261-1267.
- Smedsgaard, J., Nielsen, J., (2005) Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *J. Exp. Bot.* **56**, 273–286.
- Szyperski, T., (1998) ¹³C-NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. *Q. Rev. Biophys.* **31**, 41–106.
- Tong, A.H., Drees, B., Nardelli, G., Bader, G.D., Brannetti, B., Castagnoli, L., Evangelista, M., Ferracuti, S., Nelson, B., Paoluzi, S., Quondam, M., Zucconi, A., Hoque, C.W., Fields, S., Boone, C., Cesareni, G., (2002) A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science* **295**, 321-324.
- Usaite, R., Patil, K.R., Grotkjær, T., Nielsen, J., Regenber, B., (2006) Global transcriptional and physiological responses of *Saccharomyces cerevisiae* to Ammonium, L-Alanine, or L-Glutamine limitation. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6194-6203.
- Varela, C., Cardenas, J., Melo, F., Agosin, E., (2005) Quantitative analysis of wine yeast gene expression profiles under winemaking conditions. *Yeast* **22**, 369–383.
- Vemuri, G.N., Aristidou, A.A., (2005) Metabolic engineering in the –omics era: Elucidating and modulating regulatory networks. *Microbiol. Mol. Biol. Revs* **69**, 197-216.

- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B., Labarre, J., (2001) A proteome analysis of the Cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **276**, 8469-8474.
- Villas-Bôas, S.G., Mas, S., Åkesson, M., Smedsgaard, J., Nielsen, J., (2005) Mass spectrometry in metabolome analysis. Mass Spectrom. Revs **24**, 613-646.
- Villas-Bôas, S.G., Roessner, U., Hansen, M.A.E., Smedsgaard, J., Nielsen, J., (2007) Yeast Metabolomics: The discovery of new metabolic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Metabolome Analysis. John Wiley & Sons, Inc.
- Volschenk, H., Viljoen, M., Grobler, J., Petzold, B., Bauer, F., Subden, R.E., Young, R.A., Lonvaud-Funel, A., Denayrolles, M., Van Vuuren, H.J.J., (1997) Engineering pathways for malate degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. Nat. Biotechnol. **15**, 253-257.
- Walhout, A.J., Reboul, J., Shtanko, O., Bertin, N., Vaglio, P., Ge, H., Lee, H., Doucette-Stamm, L., Gunsalus, K.C., Schetter, A.J., Morton, D.G., Kemphues, K.J., Reinke, V., Kim, S.K., Piano, F., Vidal, M., (2002) Integrating interactome, phenome, and transcriptome mapping data for the *C. elegans* germline. Curr. Biol. **12**, 1952-1958.
- Washburn, M.P., Ulaszek, R., Deciu, C., Schielts, D.M. i Yates, J.R., (2002) Analysis of quantitative proteomic data generated via multidimensional protein identification technology. Anal. Chem. **74**, 1650-1657.
- Wiechert, W., Siefke, C., de Graaf, A.A., Marx, A., (1997) Bidirectional reaction steps in metabolic networks. II. Flux estimation and statistical analysis. Biotechnol. Bioeng. **55**, 118-135.
- Wiechert, W., (2001) ¹³C metabolic flux analysis Metab. Eng. **3**, 195-206.
- Zoričić, M. (1996), Podrumarstvo, Nakladni zavod Globus, Zagreb